超纯总RNA提取试剂盒说明书

Ultra Pure Total RNA Extraction Kit Handbook

适用样本类型：动物组织、培养细胞、血液、植物等

20-40分钟内从样本中快速分离纯化总RNA

萃取技术和柱纯化技术的完美结合

不使用易挥发的有毒试剂氯仿

无需异丙醇沉淀步骤

杭州新景生物试剂开发有限公司

HANGZHOU SIMGEN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.

地址：浙江省杭州市西湖科技经济园西园一路8号4幢5F

技术支持：400-0099-857　　邮箱：technical@simgen.cn

电话：0571-87381295　　0571-87381297

传真：0571-87381297　　邮编：310030

网址：www.simgen.cn

【医疗器械注册证书编号】 浙杭械备 20170417 号

【医疗器械生产企业许可证编号】 浙杭食药监械生产备 20170004 号

版本：2026年7月

目录

产品组成…… 1
产品储存与有效期…… 1
用户需自备的试剂与物品…… 1
技术支持…… 1
质量保证…… 1
产品介绍…… 2
防止 RNA 酶污染的注意事项…… 2
其他需要注意的事项…… 2
产品适用的样本范围…… 3
操作步骤分析与说明…… 3
样本 RNA 的释放…… 3
柱纯化技术 …… 3
柱上消化 DNA…… 4
使用前准备…… 4
操作流程图示…… 5
从易匀浆的动物组织（肌肉、肝脏及脑等组织）中分离纯化总 RNA…… 6
从培养的动物细胞中分离纯化总 RNA…… 7
从植物组织 / 植物细胞 / 细菌中分离纯化总 RNA…… 8
从全血或骨髓中分离纯化总 RNA…… 9
从动物的骨头、结缔组织（皮肤等）中分离纯化总 RNA……10
常见问题分析……11
使用 Simgen 超纯总 RNA 提取试剂盒发表的部分论文…… 13

产品组成

超纯总 RNA 提取试剂盒 Cat. No.	5 次制备 5003005	50 次制备 5003050
研磨棒	5 支	50 支
核酸纯化柱	5 套	50 套
RNase-free 1.5 ml 收集管	5 个	50 个
Buffer TL	6 ml	55 ml
Buffer EX	1.2 ml	12 ml
Buffer DW（浓缩液）	1 ml（需加无水乙醇 2.5 ml）	10 ml（需加无水乙醇 25 ml）
Buffer WA（浓缩液）	1.9 ml（需加无水乙醇 2.5 ml）	12 ml（需加无水乙醇 16 ml）
Buffer WBR（浓缩液）	1.5 ml（需加无水乙醇 3.5 ml）	10 ml（需加无水乙醇 25 ml）
RNase-free Water	1.5 ml	2 ml×3
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

Buffer TL 可室温运输，收到后请置于 2~8℃储存，其他试剂和物品储存于常温（0~30℃），可在三年内保持使用性能无明显变化。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. 1.5 ml 离心管（推荐选用 RNase-free 的 1.5 ml 离心管）
3. 移液器及吸头（为避免 RNA 酶的污染，请选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头）
4. 乳胶手套、一次性口罩等防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 旋涡振荡器
7. 无 RNA 酶使用的 RNA 提取专用实验室
8. 可能需要液氮及研钵、RNA 样本保存液（Simgen Cat. No. 4007100）、DNase I柱上消化试剂盒（Simgen Cat. No. 8010050）、PBS Buffer（Simgen Cat. No. 9004500）、红细胞裂解液（Simgen Cat. No. 9000500）

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：QQ: 869912443，微信公众号：simgenbio，e-mail: technical@simgen.cn，电话：400-0099-857。

质量保证

杭州新景生物试剂开发有限公司保证所提供的产品是通过质量检验的合格产品。如果用户在使用中发现产品不能满足实验需求，请立即停止使用产品，并联络我公司技术支持获取帮助；或者直接联络我公司当地代理商，提出产品更换要求。根据我们以往的经验，用户选择的样本差异是导致结果差异的最主要原因，如果需要从一些罕见的样本中分离纯化 RNA，请务必与我们的技术支持沟通后再进行实验操作。

产品介绍

Buffer TL 是即用型细胞和组织总 RNA 提取试剂。在匀质化或溶解的样本中，Buffer TL 能溶解细胞并释放 RNA，同时可保持 RNA 的完整性。加入 Buffer EX 萃取离心后，细胞裂解产物分离成水相和有机相，RNA 存在于水相中。在含有 RNA 的水相中补加 Buffer DW 后加入核酸纯化柱中离心，≥200 nt 的 RNA 会吸附到核酸纯化柱上（<200 nt 的 RNA 会被选择性的筛除），经 Buffer WA 和 Buffer WBR 洗涤除去残留的蛋白与 PCR 抑制物后，用 RNase-free Water 洗脱 RNA，即可用于各种分子生物学实验。

通过萃取技术与柱纯化技术的完美结合，本试剂盒分离纯化 RNA 的整个过程可在 20-40 分钟内完成。与经典的 Trizol 沉淀法相比，本试剂盒获得的 RNA 的盐分、蛋白残留更低，可直接用于 Northern blot 分析、斑点杂交、poly(A)+选择、体外翻译、RNA 酶保护分析等实验。

防止 RNA 酶污染的注意事项

由于 RNA 酶的活性稳定且耐高温，进行 RNA 分离纯化时，必须遵守以下注意事项：

1. 提取 RNA 的实验室必须是专用的单独实验室，并且 RNA 专用实验室要和经常使用 RNA 酶（例如质粒 DNA 的提取）的实验室离得越远越好。
2. RNA 提取实验全过程必须穿戴手套、口罩及专用实验服。因为唾液、汗液中都含有 RNA 酶，并且皮肤上共生的细菌和真菌，也是 RNA 酶的一个来源。如果没有细致的防护措施，这些污染物都有可能留在最终制备的 RNA 中，造成 RNA 的降解。因此良好的微生物操作技术可防止 RNA 酶污染。
3. 使用无 RNA 酶的实验器材。必须采购标有“RNase-free”字样的离心管、移液器吸头（推荐带滤芯吸头）用于 RNA 提取。如果离心管或移液器吸头无“RNase-free”标识，则在使用前必须经过 0.1% DEPC 水 37℃过夜浸泡，并高温高压灭菌处理。用作 RNA 提取的所有设备、仪器（特别是移液器）均不应与其他实验室混用，特别是要绝对禁止与经常使用 RNA 酶的实验室混用。
4. 提取 RNA 必须使用新鲜获取的样本；或者将新鲜采集的样本及时置于 - 70℃以下保存。如果不能立即置于 - 70℃以下保存，则可选购 RNA 样本保存液（Simgen Cat. No. 4007020/4007100）保存样本。样本前处理时必须在低温下操作，例如液氮研磨样本；或者在加入变性剂（例如 Buffer TL）的条件下常温研磨样本。

其他需要注意的事项

警告！

Buffer TL 含有苯酚和胍盐成分，与皮肤接触会导致灼伤，如果不慎与皮肤接触，应立即用碱性洗涤剂和大量清水冲洗，必要时请寻求医疗帮助。Buffer EX 与 Buffer WA 含刺激性化合物，如不慎沾染皮肤、眼睛时，须立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时请寻求医疗帮助。

当使用 Buffer TL、Buffer EX、Buffer WA 工作时，请穿戴乳胶手套、口罩、防护眼镜和实验服，避免沾染皮肤、眼睛，谨防吸入口鼻。

产品适用的样本范围

本产品可用于各种动物、植物、细菌来源的组织或细胞中 RNA 的分离纯化。推荐的起始样本量如下表：

样本	推荐用量
动物组织（肝脏、脑等易匀浆组织）	50~100 mg
动物组织（皮肤、骨头等组织）*	100~200 mg
血液（红细胞有核生物）	200 µl
血液（红细胞无核生物）	0.3~5 ml
培养细胞	5~10×10^6
细菌	50~100 mg
植物组织*	50~100 mg

* 动物软骨组织和某些植物组织中多糖含量较高，不适用本产品，推荐使用高多糖多酚植物总 RNA 试剂盒（Simgen Cat. No. 5103050）提取 RNA。

操作步骤分析与说明

1. 样本 RNA 的释放

(1) 对于易处理的样本（例如培养细胞、全血等），只需加入 1 ml 的 Buffer TL，用移液器吹打即可释放 RNA。

(2) 对于容易匀浆的样本（例如肌肉组织、肝脏组织等），可加入 500 µl Buffer TL 至含样本的 1.5 ml 离心管中，用研磨棒研磨至无明显颗粒状，再补加 500 µl Buffer TL 混匀即可释放 RNA。

(3) 对于难以匀浆的样本（例如皮肤组织、植物组织等），则需在含样本的研钵中加液氮速冻样本并立即研磨至粉末状（也可用冷冻研磨仪将样本研磨至粉末状），再加入 1 ml Buffer TL 混匀释放 RNA。

2. 柱纯化技术

(1) RNA 结合

在含有 RNA 的水相中补加同体积的 Buffer DW（也可使用 DEPC 水配制的 70%乙醇），混匀后加入纯化柱中离心数十秒，即可使 RNA 吸附到纯化柱的硅胶膜上，PCR 抑制物或者抑制下游分子生物学反应的杂质则被过滤除去。

(2) 洗涤

A. 纯化柱上通常会残留少量蛋白，Buffer WA 能有效地洗去这些残留的蛋白。

B. Buffer WBR 会洗去残留在膜上的 Buffer WA，确保纯净的 RNA 吸附在纯化柱上。

C. RNA 结合、洗涤的过程中只需要使溶液滤过纯化柱即可，对离心速度和离心时间并无严格的要求，可以选用离心机中的“short run”模式运行以节约操作时间。

(3) 离心甩干

将洗净后的纯化柱放回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 离心 1 分钟（如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，我们建议至少使用 12000-13000 rpm 离心 2 分钟）的作用：

A. 使 Buffer WBR 被充分地离心除去。

B. 在丢弃 Buffer WBR 滤液的过程中，如果有滤液不慎沾染到纯化柱底部，也可被离心除去。

(4) 洗脱 RNA

A. 推荐使用试剂盒中提供的 RNase-free Water 和 RNase-free 1.5 ml 收集管洗脱 RNA。

B. 37℃预热的 RNase-free Water 能提高 RNA 的洗脱效率。

C. 将 RNase-free Water 加入纯化柱后延长静置的时间（延长至 3-5 分钟）能提高 RNA 的洗脱效率。

D. 离心甩干后的纯化柱可直接加入 RNase-free Water 洗脱 RNA，无需打开纯化柱盖子挥发残留的乙醇，过度干燥的纯化柱会不利于 RNA 的洗脱。

E. 洗脱的 RNA 长度≥200 nt，<200 nt 的 RNA 绝大部分会被纯化柱筛除。

F. 出于产品使用安全的考虑，如果离心机没有防泄漏的盖子，我们建议在洗脱 RNA 的时候将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，避免 RNase-free 1.5 ml 收集管的管盖脱落而损伤离心机。

3. 柱上消化 DNA

试剂盒在分相萃取的过程中可去除大部分的 DNA，如果选购的 cDNA 试剂盒已经含有 DNase I消化步骤（例如 Simgen cDNA 第一链合成试剂盒，Cat. No. 7306025/7306100），则无需进行 DNase I柱上消化步骤。如果针对一些敏感的下游实验，必须要彻底去除残留的微量 DNA 的前提下，可单独订购 Simgen DNase I柱上消化试剂盒（Cat. No. 8010050）进行柱上消化 DNA 的步骤，具体如下：

将操作步骤 6 “**弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500 µl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**”替换成以下 3 个步骤：

(1) 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500 µl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中。

(2) 取 5 µl DNase I 加入到一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管管底，再加入 45 µl Buffer RDD，勿弃吸头，直接用移液器温和地吹打几次混合均匀，将混合液全部加到核酸纯化柱的膜中央，室温(20–30℃)静置 15 分钟。

(3) 在核酸纯化柱中加入 500 µl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer DW、Buffer WA 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
3. 因为唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，所以 RNA 提取的全过程都需要戴乳胶手套和口罩。

操作流程图示

扫描二维码观看操作视频



样本经过低温研磨等处理后，加入 1 ml Buffer TL 裂解

加入 200 µl Buffer EX，用力摇晃 15 秒混匀

12000 rpm 离心 15 分钟

吸取 600 µl 上层水相和 600 µl Buffer DW 混匀

分两次将混合液离心滤过核酸纯化柱

先后加入 500 µl Buffer WA 和 600 µl Buffer WBR 洗涤纯化柱

高速空离甩干

加入 50 µl RNase-free Water 洗脱 RNA

从易匀浆的动物组织（肌肉、肝脏及脑等组织）中分离纯化总 RNA

1. **称取 50~100 mg 动物组织，快速切成小颗粒后立即转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入 500 µl Buffer TL，用研磨棒研磨至无明显颗粒，补加 500 µl Buffer TL，盖上管盖，用力摇晃 15 秒混匀。**

* 尽量减短切碎组织所花的时间，以减少组织内源性的 RNA 酶对 RNA 的降解。

* 可选步骤：若样本中含有较多蛋白质、脂肪、多糖或胞外物质（肌肉部分等），可于 12000 rpm 离心 5 分钟取上清。离心得到的沉淀中包括细胞外膜，多糖，高分子量 DNA，上清中含有 RNA。处理脂肪组织时，如果上层有大量油脂应去除，取澄清的匀浆液进行下一步操作。

2. **加入 200 µl Buffer EX，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟。**
3. **吸取 600 µl 上层水相转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入 600 µl Buffer DW，勿弃吸头，直接用移液器吸注两次混匀，进入步骤 4 的操作。**

* 确认在 Buffer DW 中已经加入无水乙醇。

4. **吸取 600 µl 混合液转移到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**
5. **弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，将 1.5 ml 离心管中剩余的混合液全部转移到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

**** 若需柱上消化 DNA，请参考第 4 页“3.柱上消化 DNA”替换步骤 6 的内容。***

6. **弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500 µl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

7. **弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 600 µl Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8. **弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 离心 1 分钟。**

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

9. **弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个新的 RNase-free 1.5 ml 收集管中，在核酸纯化柱的膜中央加入 50 µl RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

10. **弃核酸纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于－70℃以下备用。**

从培养的动物细胞中分离纯化总 RNA

贴壁培养的细胞样本请按步骤 1a 操作；悬浮培养的细胞样本请按步骤 1b 操作。

1a. 每 10 cm^2 培养细胞中加入 1 ml Buffer TL（例如直径为 3.5 cm 的细胞培养皿，弃尽培养基后，直接加入 1 ml Buffer TL），勿弃吸头，直接用移液器吹打细胞数次使细胞溶解，吸取匀浆液转移到一个 1.5 ml 离心管中，进入步骤 2 的操作。

1b. 用 1.5 ml 离心管离心收集 5~10×10^6 的细胞，加入 100 µl PBS Buffer（Simgen Cat. No. 9004500，用户自备），旋涡振荡直至细胞全部悬浮。加入 1 ml Buffer TL，勿弃吸头，直接用移液器吹打细胞数次使细胞溶解，进入步骤 2 的操作。

2. 加入 200 µl Buffer EX，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟。

3. 吸取 600 µl 上层水相转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入 600 µl Buffer DW，勿弃吸头，直接用移液器吸注两次混匀，进入步骤 4 的操作。

* 确认在 Buffer DW 中已经加入无水乙醇。

4. 吸取 600 µl 混合液转移到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

5. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，将 1.5 ml 离心管中剩余的混合液全部转移到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

**** 若需柱上消化 DNA，请参考第 4 页“3.柱上消化 DNA”替换步骤 6 的内容。***

6. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500 µl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

7. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 600 µl Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

9. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个新的 RNase-free 1.5 ml 收集管中，在核酸纯化柱的膜中央加入 50 µl RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

10. 弃核酸纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于－70℃以下备用。

从植物组织／植物细胞／细菌中分离纯化总 RNA

1. **收集 300~500 mg 样本并转移到研钵中，加入液氮后将样本研磨至粉末状。再用液氮预冷过的 1.5 ml 离心管称取 50~100 mg 粉末，加入 1 ml Buffer TL，用力摇晃 15 秒混匀。**

* 也可用 2 ml 离心管直接称取 50~100 mg 样本，用冷冻研磨仪研磨至粉末状，加入 1 ml Buffer TL，用力摇晃 15 秒混匀。

* 尽量在样本尚未融化前加入 Buffer TL，以减少组织内源性的 RNA 酶对 RNA 的降解。

* 可选步骤：若样本中含有较多蛋白质、脂肪或胞外物质（植物结节部分等），可于 12000 rpm 离心 5 分钟取上清。离心得到的沉淀中包括细胞外膜，多糖，高分子量 DNA，上清中含有 RNA。如果样本中脂肪含量高，上层的油脂应去除，取澄清的匀浆液进行下一步操作。

* 如果植物样本中含大量多糖，请参考第 12 页“常见问题分析”中“3. RNA 提取得率低”内容解决。

2. **加入 200 µl Buffer EX，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟。**
3. **吸取 600 µl 上层水相转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入 600 µl Buffer DW，勿弃吸头，直接用移液器吸注两次混匀，进入步骤 4 的操作。**

* 确认在 Buffer DW 中已经加入无水乙醇。

4. **吸取 600 µl 混合液转移到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**
5. **弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，将 1.5 ml 离心管中剩余的混合液全部转移到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

**** 若需柱上消化 DNA，请参考第 4 页“3.柱上消化 DNA”替换步骤 6 的内容。***

6. **弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500 µl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

7. **弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 600 µl Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8. **弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 离心 1 分钟。**

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

9. **弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个新的 RNase-free 1.5 ml 收集管中，在核酸纯化柱的膜中央加入 50 µl RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

10. **弃核酸纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于－70℃以下备用。**

从全血或骨髓中分离纯化总 RNA

无核红细胞抗凝全血或骨髓样本请按步骤 1a 操作（冷冻溶血的样本不适用）；有核红细胞抗凝全血样本请按步骤 1b 操作。

1a. 取 300 µl 抗凝全血或骨髓到离心管中，加入 1.2 ml 红细胞裂解液（Simgen Cat. No. 9000500，用户自备），盖上管盖，颠倒混匀，室温静置 5 分钟，3000 rpm 离心 5 分钟，弃上清，保留管底白细胞沉淀。手指轻弹离心管使细胞沉淀分散，加入 1 ml Buffer TL，勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，进入步骤 2 的操作。

* 300 µl 抗凝全血一般能提取到 1-2 µg RNA，如果需要增加抗凝全血的用量，请按比例增加红细胞裂解液的用量，其它条件不变。

* 如果样本已经被冷冻（例如冻存在－70℃冰箱），请选用 Simgen 全血总 RNA 试剂盒（Cat. No.：5201050）提取 RNA。

1b. 取 200 µl 抗凝全血到 1.5 ml 离心管中，加入 1 ml Buffer TL，勿弃吸头，直接用移液器吹打血样数次使细胞溶解，进入步骤 2 的操作。

2. 加入 200 µl Buffer EX，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟。

3. 吸取 600 µl 上层水相转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入 600 µl Buffer DW，勿弃吸头，直接用移液器吸注两次混匀，进入步骤 4 的操作。

* 确认在 Buffer DW 中已经加入无水乙醇。

4. 吸取 600 µl 混合液转移到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

5. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，将 1.5 ml 离心管中剩余的混合液全部转移到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

**** 若需柱上消化 DNA，请参考第 4 页“3.柱上消化 DNA”替换步骤 6 的内容。***

6. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500 µl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

7. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 600 µl Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

9. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个新的 RNase-free 1.5 ml 收集管中，在核酸纯化柱的膜中央加入 50 µl RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

10. 弃核酸纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于－70℃以下备用。

从动物的骨头、结缔组织（皮肤等）中分离纯化总 RNA

1. **先将骨头用锤子敲碎或将组织切碎，称取 400~600 mg 碎片并转移到研钵中，加入液氮后将样本碎片研磨至粉末状。用液氮预冷过的 1.5 ml 离心管称取 100~200 mg 粉末，加入 1 ml Buffer TL，用力摇晃 15 秒混匀。**

* 尽量在样本尚未融化前加入 Buffer TL，以减少组织内源性的 RNA 酶对 RNA 的降解。

* 如果样本量较少（≤100 mg），可先在研钵中加液氮将样本研磨成粉末状，然后直接加 1 ml Buffer TL 至研钵中，再继续研磨约 30 秒使研钵中的样本溶解到 Buffer TL 中，吸取匀浆液至一个 1.5 ml 离心管中，进入步骤 2 的操作。

* 如果骨头样本中含大量软骨，请参考第 12 页“常见问题分析”中“3. RNA 提取得率低”内容解决。

2. **加入 200 µl Buffer EX，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟。**
3. **吸取 600 µl 上层水相转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入 600 µl Buffer DW，勿弃吸头，直接用移液器吸注两次混匀，进入步骤 4 的操作。**

* 确认在 Buffer DW 中已经加入无水乙醇。

4. **吸取 600 µl 混合液转移到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**
5. **弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，将 1.5 ml 离心管中剩余的混合液全部转移到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

**** 若需柱上消化 DNA，请参考第 4 页“3.柱上消化 DNA”替换步骤 6 的内容。***

6. **弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500 µl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

7. **弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 600 µl Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8. **弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 离心 1 分钟。**

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

9. **弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个新的 RNase-free 1.5 ml 收集管中，在核酸纯化柱的膜中央加入 50 µl RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

10. **弃核酸纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于－70℃以下备用。**

常见问题分析

1. 纯化柱堵塞

(1) 样本中 RNA 含量太高。请参考第 3 页“产品适用的样本范围”，减少样本的使用量。

(2) 样本中多糖含量太高。例如一些植物的块茎、果实、种子及衰老的叶片（主要是淀粉类的多糖衍生物）和软骨组织（软骨属于多糖类物质）等。如果碰到纯化柱堵塞情况，请立即停止产品的使用，并与我们的经销商联系退换货事宜。

* 大多数由于多糖含量高产生问题的样本均可以通过将试剂盒更换成植物总 RNA 试剂盒（Simgen Cat. No. 5101050）后得到解决。如果是果肉类样本（水分含量高的），推荐选择果肉总 RNA 试剂盒（Simgen Cat. No. 5102050）。一些产生特殊粘多糖的植物样本或真菌样本，用植物总 RNA 试剂盒提取 RNA 时可能会堵塞纯化柱，则必须选择高多糖多酚植物总 RNA 试剂盒（Simgen Cat. No. 5103050）提取 RNA。

2. RNA 降解

(1) 新鲜样本前处理操作不当。某些富含内源核酸酶的样本（如胰腺、脾脏、肝脏、胸腺等）不可直接匀浆，必须在低温条件（例如液氮）下匀浆处理或者在加入变性剂（例如 Buffer TL）的条件下常温研磨。

(2) 使用陈旧且保存不当的样本。组织样本取材后应立即置于液氮中速冻，然后移至 - 70℃冰箱保存；细胞样本应在收集后直接加入 1 ml Buffer TL，吹打溶解后移至 - 70℃冰箱保存。如果样本不能立即放入 - 70℃冰箱保存，可选购 RNA 样本保存液（Simgen Cat. No. 4007020/4007100）保存样本。使用 RNA 样本保存液时，应注意以下事项：

A. 只选用新鲜的、未反复冻融的样本加入 RNA 样本保存液保存；

B. 样本加入 RNA 样本保存液后不要长时间室温存放。RNA 样本保存液保存样本是有时间期限的，一般在 37℃只能保存 1 天，在 15-25℃可保存 1 周，在 4℃可保存 1 个月，若要长期保存，应保存在 - 20℃以下。

(3) 外源 RNA 酶的污染。试剂、器械及实验环境中的 RNA 酶进入实验系统。参考第 2 页“防止 RNA 酶污染的注意事项”改善实验条件和实验环境，并确保在 RNA 提取专用实验室提取 RNA。

(4) 电泳检测时，推荐使用甲醛变性胶电泳（参考分子克隆第三版第 540 页）。如果没有甲醛变性胶电泳的条件，关注 simgenbio 微信公众号，搜索“如何做好 RNA 电泳实验”文章，获取相关实验技巧。

3. RNA 提取得率低

(1) 样本中 RNA 含量低。请参考第 3 页“产品适用的样本范围”，适当增加样本的使用量。

(2) 样本中多糖含量高。例如一些植物组织和软骨组织（软骨属于多糖类物质）等，RNA 得率可能非常低。其原因是多糖类物质会和 Buffer TL 形成不可溶解的沉淀，而 RNA 会被包裹在沉淀中。如果碰到上述情况，请立即停止产品的使用，并与我们的经销商联系退换货事宜。

(3) 样本未充分破碎或匀浆不彻底。请参考第 3 页“产品适用的样本范围”选择合适的样本起始量并增加匀浆时间。

(4) Buffer DW、Buffer WA、Buffer WBR 中未加入无水乙醇。请确保试剂盒使用前已经在 Buffer DW、Buffer WA 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇。

(5) 洗脱效率低。请参考第 4 页“柱纯化技术”中的“（4） 洗脱 RNA”内容优化 RNA 的洗脱方案。

4. RNA 后续实验效果不佳

(1) 盐分残留过多。注意 Buffer WA 和 Buffer WBR 的洗涤顺序，确保按正确的顺序洗涤核酸纯化柱。

(2) 乙醇残留过多。注意高速空离步骤不可省略，并且空离后的核酸纯化柱应小心取出，避免倒置，以免 2 ml 收集管管底的残留滤液接触到核酸纯化柱。

(3) 使用了过多的 RNA 用作反转录模板。通常 20 µl 反转录反应体系中加入 100~1000 ng RNA 作为模板比较适宜。注意 cDNA 作为 PCR 模板时需要适当稀释，以免残留的反转录酶（包括已经失活的反转录酶）干扰 Taq 酶的活性。

(4) 反转录后的 DNA-RNA 复合体对荧光 PCR 的影响。建议减少随机引物的用量或用特异性引物进行反转录，或者在反转录后添加 RNase H 进行处理，去除 DNA-RNA 复合体。

5. DNA 残留

(1) 样本用量过多。请参考第 3 页“产品适用的样本范围”选择合适的样本起始量。

(2) 吸取水相时吸到了中间相。小心缓慢地吸取水相，若不慎吸取到中间相，可将液体打回离心管，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟后更换新吸头小心吸取水相。

(3) 分相没有完全分开。加入 Buffer EX 后确保用力摇晃混匀，12000 rpm 离心 15 分钟，不要用旋涡振荡代替摇晃。

(4) 样本预先用其他试剂处理过。确保起始样本不含有机溶剂（例如乙醇、DMSO）、强缓冲液或碱性试剂，这些试剂会干扰相分离。

使用 Simgen 超纯总 RNA 提取试剂盒发表的部分论文

1. Rong J, Cheng T, Liu X, et al. Development of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens[J]. Vaccine, 2005, 23(40): 4844-4851.
2. Diao X, Han Y, Liu C. The fungicidal activity of tebuconazole enantiomers against Fusarium graminearum and its selective effect on DON production under different conditions[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2018, 66(14): 3637-3643.
3. Zhang M, Li G, Sun X, et al. MET amplification, expression, and exon 14 mutations in colorectal adenocarcinoma[J]. Human pathology, 2018, 77: 108-115.
4. Li G, Kuang H, Guo H, et al. Development of a recombinant VP2 vaccine for the prevention of novel variant strains of infectious bursal disease virus[J]. Avian Pathology, 2020, 49(6): 557-571.
5. Ayaz A, Huang H, Zheng M, et al. Molecular cloning and functional analysis of GmLACS2-3 reveals its involvement in cutin and suberin biosynthesis along with abiotic stress tolerance[J]. International journal of molecular sciences, 2021, 22(17): 9175.
6. Wang X, Zhu H, He Y, et al. A novel homozygous mutation in the PADI6 gene causes early embryo arrest[J]. Reproductive Health, 2022, 19(1): 190.
7. Mu Z, Shen S, Tang L, et al. Hyperin promotes proliferation, migration, and invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells via activation of JAK1/STAT3 pathway in recurrent spontaneous abortions[J]. Heliyon, 2023, 9(1).
8. Li H, Qin Y, Huang Y, et al. SPAG5, the upstream protein of Wnt and the target of curcumin, inhibits hepatocellular carcinoma[J]. Oncology Reports, 2023, 50(3): 172.
9. Liu Y, Guo W, Hong S L. Aerobic exercise mitigates hippocampal neuronal apoptosis by regulating DAPK1/CDKN2A/REDD1/FoXO1/FasL signaling pathway in D-galactose-induced aging mice[J]. The FASEB Journal, 2023, 37(10): e23205.
10. Zhou C, Li J, Zheng C, et al. Neuroprotective effects of Jie-du-huo-xue decoction on microglia pyroptosis after cerebral ischemia and reperfusion——From the perspective of glial-vascular unit[J]. Journal of ethnopharmacology, 2024, 318: 116990.
11. Liu Y, Meng X K, Shao W, et al. miR-34a/TAN1/CREB axis engages in alleviating oligodendrocyte trophic factor-induced myelin repair function and astrocyte-dependent neuroinflammation in the early stages of Alzheimer's disease: the anti-neurodegenerative effect of treadmill exercise[J]. Neurochemical Research, 2024, 49(4): 1105-1120.
12. Liu Y, Meng X, Tang C, et al. Aerobic exercise modulates RIPK1-mediated MAP3K5/JNK and NF-κB pathways to suppress microglia activation and neuroinflammation in the hippocampus of D-gal-induced accelerated aging mice[J]. Physiology & Behavior, 2024, 286: 114676.
13. Zeng F, Wang M J, Li Z, et al. Overexpression of the circadian gene Bmal1 regulates the Nrf2/HO-1 oxidative stress pathway to alleviate inflammation and apoptosis in PC12 cells following cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Medicine, 2025, 104(24): e42763.
14. Zhou X, Ma D, He Y X, et al. Kangfuxin solution alleviates esophageal stenosis after endoscopic submucosal dissection: A natural ingredient strategy[J]. World Journal of Gastroenterology, 2025, 31(1): 98561.